

蛋白激酶 C 研究的最新进展

杨 或 于秉治

(中国医科大学生物化学教研室, 沈阳 110001)

摘要 作为能使蛋白激酶 C (PKC) 活化的第二信使甘油二酯 (DAG) 不仅可由磷脂酰肌醇 (PtdIns) 水解产生, 大量实验表明还可从磷脂酰胆碱 (PC) 水解而来, 其中磷脂酶 C (PLC) 及磷脂酶 D (PLD) 参与了这一过程. 磷脂酶 A₂ (PLA₂) 的作用产物脂肪酸 (FA) 也能激活 PKC. PKC 至少有 10 种亚型, 依据其活化方式可分三大类: 典型 PKC, 新 PKC 和非典型 PKC. PKC 参与了基因表达的调控.

关键词 蛋白激酶 C, 甘油二酯, 磷脂酶 C, 磷脂酶 D, 磷脂酶 A₂, 亚型

自 Nishizuka 发现蛋白激酶 C (PKC) 以来, 因其广泛参与细胞信息传递、分泌、离子通道调节、细胞增殖、分化及癌变等一系列与生命现象相关的过程而成为生物界和医学界研究的一大热点. 十几年来, 有关 PKC 的研究取得了突飞猛进的进展, 本文将就 PKC 的活化机制、PKC 亚型的研究及 PKC 对基因表达的调控等有关 PKC 的最新研究进展做一综述.

1 甘油二酯 (DAG) 与 PKC 活化

细胞接受外界信息后可产生 DAG, 最初来源于磷脂酰肌醇 (PtdIns) 的分解, 接着又会有一个 DAG 的持续增高. 通过脂肪酸分析表明, 后一阶段的 DAG 可能由于各种接受信息的细胞如中性粒细胞、肝细胞、成纤维细胞和乳腺细胞中磷脂酰胆碱 (PC) 水解而来^[1,2]. Kawahara 等用同位素标记研究表明, 无论是内源产生或外加的 DAG 都很快被代谢掉. 在血小板中, 由于 DAG 激酶的作用, DAG 大量转化成磷脂酸而后转化成肌醇磷脂 (P-inositol), 而在淋巴细胞中, 外源性 DAG 很快被 DAG 酯酶和一些非特异性酯酶水解. 佛波醇酯 (phorbol ester) 有和 DAG 相似的作用, 它能激活 PKC, 但是其代谢稳定. 加入多倍量 DAG 证实: PKC 的持续活化是细胞长效反应如 T 淋巴细胞活化

及 HL-60 细胞分化成巨噬细胞的先决条件, 而相应的, 单倍量的佛波醇酯却能够产生相同的细胞反应.

2 磷脂酶 D (PLD) 在 PKC 活化中的作用

细胞接受信号刺激后引起的 PC 向 DAG 转化大致有以下三种途径 (图 1).

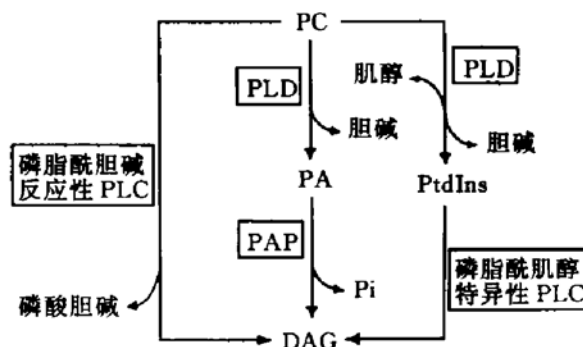


图 1 自 PC 产生 DAG 途径

PC: 磷脂酰胆碱; Pi: 无机磷酸; DAG: 甘油二酯; PtdIns: 磷脂酰肌醇; PA: 磷脂酸; PLD: 磷脂酶 D; PLC: 磷脂酶 C; PAP: 磷脂酸磷酸水解酶.

- 在 PLC 作用下 PC 水解产生 DAG;
- 在 PLD 作用下 PC 水解产生 PA, 然后

PA 在 PAP 作用下生成 DAG;

c. 在 PLD 作用下 PC 水解成 PtdIns, 然后 PtdIns 在 PLC 作用下水解产生 DAG.

有关 PLD 的研究主要是从植物开始的, 1947 年 Hanahan 从胡萝卜中首次分离出 PLD, 在一段时间内人们认为可能只有植物中有 PLD. 1973 年, Saito 从大鼠脑中证实了 PLD 的存在, 之后在其它动物组织中相继发现并分离, PLD 似乎存在于膜上, 但目前动物组织中尚无 PLD 纯化出来. PLD 水解 PC 是信号依赖性的, PLD 的动力学性质在各组织中显示其广泛的组织特异性. 鼠脑突触浆膜和肝细胞膜中 PLD 活化需要 Ca^{2+} , 并且在 Ca^{2+} 低于 $1\mu\text{mol/L}$ 时就显示出相当的活性.

在各种完整细胞中, 佛波醇酯或 DAG 均能够引起 PLD 的活化, 而且它们有时和 Ca^{2+} 载体共同起作用活化 PLD. Nakamura 等实验表明, 佛波醇酯或膜通透性 DAG 刺激细胞引起 PLD 催化 PC 的胆碱部分与游离的醇交换产生 PtdIns. PtdIns 被 PLC 水解产生 DAG 和肌醇磷脂, 导致 PKC 活化. 而活化的 PKC 又可参与 PLC 活化促进 PC 水解, 导致继续产生 DAG 和 PKC 的延续作用 (图 2).

3 磷脂酶 A_2 (PLA_2) 在 PKC 活化中的作用

PLA_2 使磷脂水解产生游离脂肪酸和溶血磷脂. PLA_2 广泛存在于动物组织中, 目前认为 PLA_2 大致有二种类型: 一是以动物胰腺中分离出的 PLA_2 , 分子量为 14 000, 称为 $\text{PLA}_2 \text{ I}$, 另一种则是从动物的其它部分如血球、脏器或炎症渗出液中分离出来的称之为 $\text{PLA}_2 \text{ II}$, 分子量也是 14 000, 二者之间结构上的区别主要在于氨基酸排列的相同性在同种间要低于 30%, 且其生理意义也不相同. 此外, 从各组织中相继发现了一些分子量从 30 000 到 110 000 的 PLA_2 , 其中一种 85 000 的已克隆出来.

最近实验表明, PLA_2 促使的 PC 分解产物顺不饱和脂肪酸 (FFA) 和溶血性磷脂酰胆碱 (lysoPC) 都是通过 PKC 途径而引起细胞的随后反应 (图 2).

DAG 可增加 PKC 与 Ca^{2+} 的表面亲和力, 因此微克分子水平的 Ca^{2+} 存在时便可使 PKC 活化, 因几种 FFA 在不同程度上能激活 PKC, 所以有人认为 FFA 可能是一种潜在的第二信使^[3]. FFA 包括油酸、亚麻酸、花生四烯酸、廿二碳六烯酸等都是 PLA_2 作用于 PtdIns 产生的. 人完整血小板动力学分析表明, 在 DAG 存在时, 这些脂肪酸和反不饱和脂肪酸没有这种功能.

PC 水解的另外产物 lysoPC 具有膜吞噬性和细胞毒性. 然而, 当 lysoPC 和 DAG 或佛波醇酯共同加入细胞中, lysoPC 可加强细胞长效生理效应, 例如, lysoPC 不能活化人的静止淋巴细胞, 而当有 DAG 和罗努霉素 (ionomycin) 时, 淋巴细胞可被激活^[4], 证明这种溶血磷脂和 PKC 途径有关.

Wijkander 和 Sundber 从鼠巨噬细胞和 Lin 等从中国地仓鼠卵巢 (CHO) 中证实了 PKC 在细胞内对 PLA_2 的活化作用. 用凝血酶预处理细胞后分离出的 PLA_2 可见丝氨酸残基的磷酸化, 这种磷酸化和酶活性都能被 PKC 的

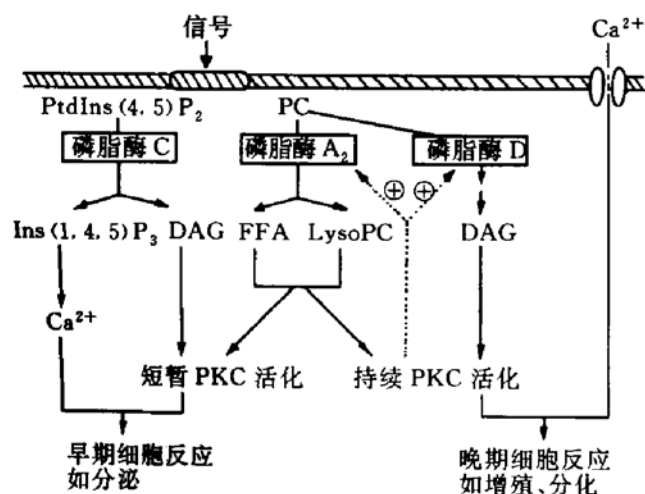


图 2 信号引起的膜磷脂降解及细胞反应

PtdIns (4, 5) P_2 : 4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇; Ins (1, 4, 5) P_3 : 1, 4, 5-三磷酸肌醇; FFA: 顺不饱和脂肪酸; lysoPC: 溶血性磷脂酰胆碱. 图中虚线所示为 PKC 对磷脂酶活化的正反馈作用.

抑制剂 staurosporin 阻断。

虽然细胞内 PLA_2 活化机制尚不清楚, 但 DAG 引起的 PKC 活化确能够使 PLA_2 催化 PC 水解过程增强, 这条途径不仅通过花生四烯酸而且也通过 FFA 和 lysoPC (见图 2)。

4 PKC 亚型及其活化特性

PKC 有多种亚型, 各亚型显示了不同的酶学特性及不同的组织表达和特定的细胞内定位。目前已明确在动物组织中有 10 种亚型, 且已分组并命名^[5-7] (图 3 和表 1)。

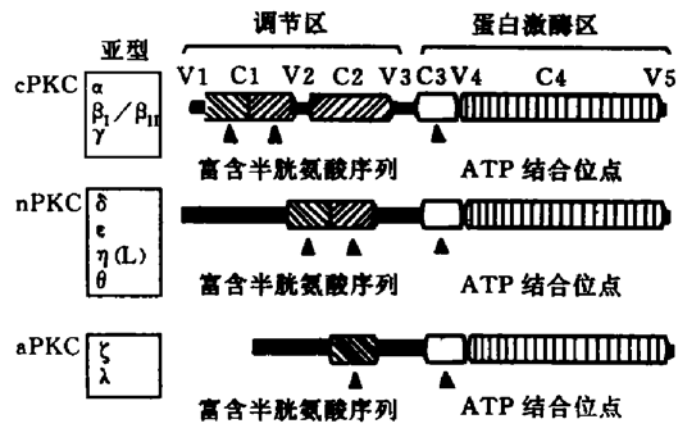


图 3 PKC 亚型结构示意图

C1—C4: 保守区; V1—V5 可变区。β₁, β₂ 起源于一个基因的不同分裂。

表 1 PKC 亚型及其特性

亚型	氨基酸残基数目	分子量	激动剂	组织表达
A 组: 典型 PKC (cPKC)				
α	672	76 799	PS, Ca ²⁺ , DG, FFA, lysoPC	广泛
β ₁	671	76 790	PS, Ca ²⁺ , DG, FFA, lysoPC	一些组织
β ₂	673	76 933	PS, Ca ²⁺ , DG, FFA, lysoPC	很多组织
γ	697	78 366	PS, Ca ²⁺ , DG, FFA, lysoPC	脑
B 组: 新 PKC (nPKC)				
δ	673	77 517	PS, DG	广泛
ε	737	83 474	PS, DG, FFA	脑和其他组织
η (L)	683	77 972	?	肺, 皮肤, 心脏
θ	707	81 571	?	骨骼肌
C 组: 非典型 PKC (aPKC)				
ζ	592	67 740	PS, FFA	广泛
λ	586	67 200	?	卵巢, 睾丸

A 组包括 4 种典型的 PKC (classical PKCs, 简写 cPKC): α, β₁, β₂ 及 γ; B 组包括 4 种新 PKC (new PKCs, 简写 nPKC): δ, ε, η 和 θ; C 组包括 2 种非典型 PKC (atypical PKCs, 简写 aPKC) ζ 和 λ。

A 组 PKC 有 4 个保守区 (C1—C4) 和 5 个可变区 (V1—V5), C1 区是推定的膜结合区, C2 区和酶对 Ca²⁺ 敏感性有关, C3 区包括水解部位, C4 区可能是与识别磷酸化底物有关。cPKC 由 Ca²⁺, PS 和 DAG 或佛波醇酯激活, 这

种激活可被顺不饱和脂肪酸和 lysoPC 进一步加强。

nPKC 缺少 C2 区, 不需要 Ca²⁺, 由 PS 和 DAG 或佛波醇酯分子团激活。ε 亚型可由 FFA 激活而 δ 却不能。δ 和 ε 都以磷酸化形式存在于组织内, 而且电泳是双条带。B 组酶可能由于与生长因子受体所引起的蛋白激酶的连锁反应相结合而调节细胞周期等一些目前尚不十分清楚的细胞内机制。

aPKC 只有一个富含半胱氨酸指形区, 它

依赖于 PS 却不受 DAG, 佛波醇酯或 Ca^{2+} 的影响, ζ 亚型由 FFA 活化.

已知的 PKC 家族的激活对 Ca^{2+} 及 PtdIns 的代谢产物需求不同, 但它们都依赖 PS. 各种亚型的活化形式、活化程度、持续时间及细胞内定位各不相同, 但各亚型的活化详细时空变化目前尚知之甚少.

5 PKC 对基因表达的调控

长期以来, 对一些与细胞增殖、分化相关的因子如何直接作用到细胞的认识是非常肤浅的, 只是笼统的认为通过某些转录因子的磷酸化、脱磷酸来调节, 具体过程却并不清楚. 最近, 大量研究表明, 有下列几个途径参与了对基因表达的调控^[8,9]: a. cAMP 反应途径 (CRE); b. TPA 反应途径 (TRE); c. 血清反应途径 (SRE); d. 某些与细胞周期相关的转录因子.

cAMP 反应途径中较肯定的是 CRE (cAMP response element) 结合蛋白 (CREB), 通常它在 DNA 上相结合的结构特点是 TGACGTCA, 所以又称之为 TGACGTCA 结合蛋白. 当细胞接受外界信息后可使 cAMP 升高, cAMP 可通过活化 PKA (蛋白激酶 A, cAMP-dependent protein kinase), 促使 CREB 的第 123 位的丝氨酸磷酸化, 从而促进转录.

在 TRE 途径 (TPA response element) 中研究较多的是 AP-1 (activator protein 1), AP-1 最初被定义为识别 TRE 的耦联 DNA 活性, 而且通过一系列基因诱导可使 PKC 活化. 分子克隆揭示 AP-1 包含一系列结构相关的转录因子, 这些因子属于 Jun 和 Fos 蛋白, 而且均能识别 TRE. AP-1 必须二聚体化后方能与 DNA 耦联. Jun 蛋白可以同种二聚体 (Jun-Jun) 或异种二聚体 (Jun-Fos) 形式和 DNA 耦联, 而 Fos 蛋白必须同 Jun 形成异种二聚体, 其中以 Jun-Fos 二聚体的 DNA 耦联活性最高. AP-1 在 DNA 上结合位点的特点是 TGAGTCA. TPA 作用到细胞后, 可与受体 PKC 相结合, 还

可直接活化 PKC, 活化后的 PKC 可进一步通过活化磷酸酶来促进转录白脱磷酸, 促使 Jun-Fos 与 DNA 结合进而促进转录. 另一个研究较多的是 NF-kB 结合部位, 结合部位特点是 GGGACTTTCC, 它是一个 50 000 及 60 000 的二聚体, 常与 I κ B 形成一个 NF-kB/I κ B 复合物存在于胞浆中, I κ B 是 NF-kB 的抑制亚基, 是 PKC 的底物. 细胞接受 TPA 刺激后, TPA 活化 PKC 的同时, 可使 I κ B 磷酸化并与 NF-kB 分离, 然后 NF-kB 向核内移动, 通过与 DNA 相结合促进转录, 详见图 4.

在 SRE (serum response element) 中, 细胞接受 EGF 刺激后, SRE 结合蛋白 (在 DNA 上结合位点的特点是 CC [AT]₆ GG) 可通过活化酪氨酸蛋白激酶 (CK I) 促进 SRE 的磷酸化, 来提高其与 DNA 的结合能, 促进转录.

总之, 细胞外的一些因子可与细胞膜上的特殊受体相结合使 PKA, PKC 等蛋白激酶活化, 进一步影响到基因表达, 对这一问题的深入研究将更加深人们对细胞调控的认识.

6 总结与展望

虽然目前对 PKC 亚型特性、功能研究很多, 但目前对它掌握的知识还很有限. Watanabe 等用佛波醇酯处理 CHO 细胞, 证明 PKC 家族在细胞周期的特殊点有调节作用. 各种 PKC 亚型独特的激活方式、组织表达形式和不同的细胞内定位显示了其在细胞内信号传递的特殊功能. 最近我们的研究表明: 在牛精子中至少有 3 种 PKC, 即 α , β , ϵ , 而且主要分布于精子的尾部, β 还存在于顶体部分. 并且我们发现有一种 PKC 的大分子抑制剂存在于顶体部分, 所以我们认为, 很可能在受精卵的发育过程中 PKC 的某种亚型 (如 β) 参与了对受精卵发育的调控作用, 因为我们实验已发现该抑制剂可抑制受精卵的发育. 如进一步研究清楚 PKC 对受精卵发育的调控作用, 可能会在有关受精卵发育机制的研究上有新的突破.

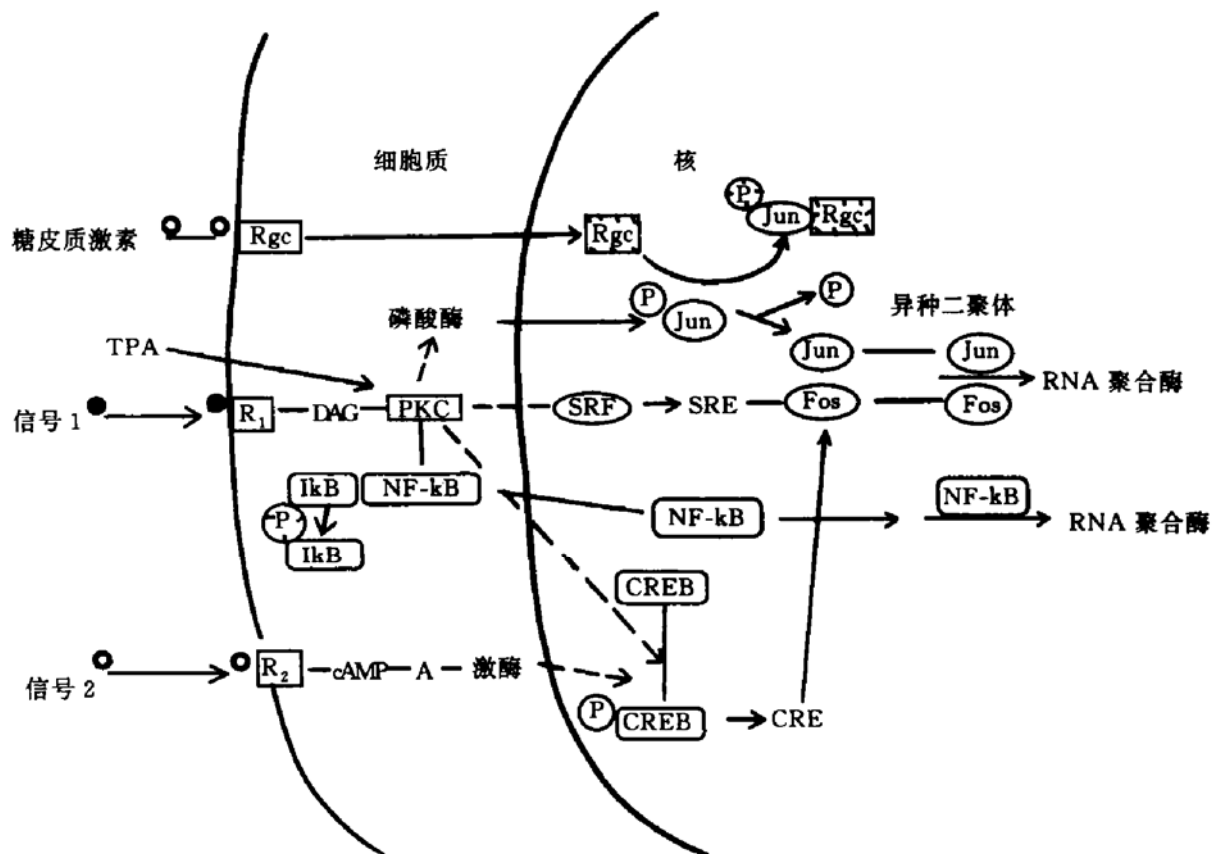


图 4 PKC 与基因表达的调控

Rgc: 糖皮质激素受体; R₁, R₂: 受体; SRF: SRE 结合蛋白; IkB: NF-kB 结合部位的抑制亚基。

参 考 文 献

- 1 Kennerly D A. J Biol Chem, 1987; **262**: 16305
- 2 Tettenborn C S, Muller G C. Biochem Biophys Res Commun, 1988; **155**: 249
- 3 Asaoka Y. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **89**: 6447
- 4 Wijkander J. Eur J Biochem, 1991; **202**: 873
- 5 Yoshida K, Asaoka Y, Nishizuka Y. Nature, 1988; **334**: 661
- 6 Osada S, Mizuno K, Saido T C. J Biol Chem, 1990; **265**: 22434
- 7 Ono Y, Fuji T, Ogita K. Proc Natl Acad Sci USA, 1989; **267**: 4799
- 8 Karin M, Smeal T. TIBS, 1992; **17**: 418
- 9 Trisman R. TIBS, 1992; **17**: 423

血管内皮生长因子与肿瘤

修 波* 周爱儒

(北京医科大学生物化学教研室, 北京 100083)

摘要 血管内皮生长因子是新近确定的一种具有旁分泌机制的生长因子, 能特异作用于血管内皮细胞, 促进其增殖及新生血管的形成, 同时还有增加血管通透性的作用。由于其生物学活性与实体瘤的生长密切相关, 因此对它的研究倍受关注, 进展非常迅速。

inflammation

The Newest Progress of Protein Kinase C. Yang Yu, Yu Bingzhi. (*Department of Biochemistry, China Medical University, Shenyang 110001*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; **21** (4): 308—312

Diacylglycerol (DAG), as the second messenger to activate protein kinase C (PKC), may be derived not only from hydrolysis of phosphatidylinositol (PtdIns), but also from hydrolysis of phosphatidylcholine (PC), in which phospholipases of the type C and D (PLC and PLD) participate. Fatty acids (FA), the products of phospholipases A₂ (PLA₂) also activates PKC. PKC has at least 10 subspecies and 3 group, namely classical PKC, new PKC and atypical PKC. PKC also participates in regulation of gene expression.

Key words protein kinase C, diacylglycerol, phospholipase C, phospholipase D, phospholipase A₂, subspecies

Vascular Endothelial Growth Factor and Tumors. Xiu Bo, Zhou Airu. (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; **21** (4): 312—317

Vascular endothelial growth factor (VEGF) with paracrine mechanism has recently been identified. Its growth-promoting activity is specific for vascular endothelial cells *in vitro*. VEGF also stimulates angiogenesis and increases blood vessel permeability *in vivo*. Because its bioactivity has a direct bearing on the growth of solid tumors, the researches on VEGF have been paid a good deal of attention and made good progress.

Key words VEGF, vascular permeability factor, vascular endothelial cell, tumor, gene

expression

RB Gene and Tumor Suppression. Gong Guosheng, Qian Liqing. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; **21** (4): 317—322

The RB gene is located at chromosome 13q14 which spans more than 150kb, with one internal gap, and its product is a phosphoprotein of about 110kD which is constantly expressed in normal retina cells. The RB Protein can specifically bind to SV40 large T, E1A and E7 antigens. The deficiency of the RB gene is the cause of retinoblastoma. Besides, RB gene mutations are detected in osteosarcomas, breast carcinomas, small-cell lung cancer (SCLC), soft-tissue sarcomas and hematopoietic proliferative disorders. The tumorigenicity can be partially or totally suppressed by introducing the RB gene into the tumor cells.

Key words RB, tumor suppressor gene, tumor suppression

Mechanism and Application of Cell Electroporation and Electrofusion. Wang Hemu, Wang Zhou. (*Department of Physics, Nankai University, Tianjin 300071*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; **21** (4): 322—326

In recent over ten years, owing to the mutual permeation and the coexperiments of biologists and physicists, a new field of biophysical technology was born and has grown up. It not only involves the basic study of cell electromagnetic effect and its mechanism, but also, as a new field in biotechnology, it relates to the wide application of many other fields, such as molecular biology, cellular biology, immunology, medicine, food and agriculture. The newest progresses in this field are summa-